



FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

***Saliva como fonte de biomarcadores
para o diagnóstico de doenças
Neurodegenerativas***

Artigo de Revisão Bibliográfica

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Daniel Filipe Sales Azevedo

Porto, 2018



MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ARTIGO DE REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**“Saliva como fonte de biomarcadores para o diagnóstico de doenças
Neurodegenerativas”**

Daniel Filipe Sales Azevedo

Estudante do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Up201305640@fmd.up.pt

***Monografia apresentada à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade
do Porto no âmbito da UC “Monografia de Investigação / Relatório de
Atividade Clínica”***

Orientador

João Miguel Silva e Costa Rodrigues

Professor Auxiliar Convidado com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da

Universidade do Porto

Porto, 2018

Resumo

A saliva constitui um fluido corporal bastante atrativo como fonte de potenciais biomarcadores para o diagnóstico de inúmeras doenças, acompanhamento terapêutico e evolução. Moléculas encontradas no cérebro humano relevantes na função do SNC e proteínas de caráter patológico associadas a doenças neurodegenerativas têm vindo a ser identificadas neste fluido oral. O objetivo deste artigo de revisão é de recolher as principais informações atuais acerca dos biomarcadores salivares presentes nas várias doenças neurodegenerativas que permitam uma maior precisão de diagnóstico, bem como possibilitem um diagnóstico precoce. A pesquisa bibliográfica foi realizada na base de dados da PubMed, onde foram procurados e analisados diversos artigos de caráter científico. Visto ser um assunto de investigação relativamente recente, a informação disponível é ainda um pouco escassa. No entanto, os resultados obtidos revelaram ser promissores na medida que se verificaram diversas proteínas salivares potencialmente capazes de serem utilizadas no futuro como ferramenta de diagnóstico de doenças neurodegenerativas em estados precoces, diferenciação entre as várias doenças e subtipos, distinção do estado individual e concordância com os níveis presentes noutros fluidos corporais. A realização de mais estudos será necessária de modo a validar estes biomarcadores salivares e que possam contribuir significativamente como uma ferramenta clínica útil, utilizados por todos os profissionais de saúde, no diagnóstico de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: doenças neurodegenerativas, biomarcadores salivares, saliva, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, lactoferrina, A β 42, sinucleína salivar, cortisol, albumina.

Abstract

Saliva is a very attractive body fluid as a source of potential biomarkers for the diagnosis of numerous diseases, therapeutic follow-up and evolution. Molecules found in the human brain relevant to CNS function and pathological proteins associated with neurodegenerative diseases were identified in this oral fluid. The objective of this review article is to collect the main and current information about the salivary biomarkers present in the various neurodegenerative diseases that allow a greater diagnostic accuracy, as well as make possible an early diagnosis. The bibliographic research was carried out in the PubMed database, where several scientific articles were searched for and analyzed. Since it was a relatively recent research subject, the available information was a little scarce. However, the results obtained were promising as several salivary proteins were able to diagnose early neurodegenerative diseases, differentiate between the various diseases and subtypes, distinguish between the individual state and concordance with the levels present in other body fluids. More studies will be needed to validate these salivary biomarkers and may contribute significantly as a useful clinical tool used by all health professionals in the diagnosis of neurodegenerative diseases.

Keywords: neurodegenerative diseases, salivary biomarkers, saliva, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, lactoferrin, A β 42, salivary synuclein, cortisol, albumin.

Agradecimentos

Ao **Professor João Rodrigues** por toda a ajuda fornecida, disponibilidade, paciência e orientação na realização deste trabalho.

À minha **família** pelo grande apoio que me deram ao longo destes 5 anos.

A todos os meus **amigos e colegas de curso** com quem aprendi bastante e passei bons momentos.

Em especial aos meus amigos **Miguel, Lucas, Mariana, Manuela, Belisa, Linda, Maria João Tavares e Maria Azevedo** com quem partilhei os melhores momentos e experiências vividas ao longo destes anos.

Índice

1	Introdução	1
1.1	A Saliva e seu Potencial como meio de Diagnóstico.....	1
2	Materiais e Métodos	5
3	Doenças Neurodegenerativas.....	6
3.1	Doença de Alzheimer	6
3.1.1	Biomarcadores salivares	7
3.2	Doença de Parkinson	14
3.2.1	Secreção salivar.....	16
3.2.2	Biomarcadores salivares	18
3.3	Esclerose lateral amiotrófica.....	25
3.3.1	Secreção salivar.....	26
3.3.2	Biomarcadores salivares	27
4	Conclusão	29
5	Referências Bibliográficas	30
6	Anexos.....	34

Índice de Figuras

<i>Figura 1 Níveis salivares de t-tau (A), p-tau (B) e proporção p-tau/t-tau (C) nos pacientes com DA e controlo saudável.(20)</i>	8
<i>Figura 2 Concentrações salivares de Aβ42 nos pacientes com doenças neurodegenerativas e controlo saudável.(15)</i>	9
<i>Figura 3 Concentrações salivares de Lactoferrina e concentrações de t-total e Aβ42 no CSF nos pacientes com DA e controlo saudável.(5)</i>	10
<i>Figura 4 Correlação entre os níveis de lactoferrina salivar e os níveis de Aβ42 e t-total no CSF nos pacientes com DA e controlo.(5)</i>	11
<i>Figura 5 Concentrações dos 7 metabolitos com importância significativa na distinção de pacientes com demência (barra cinzenta) e o controlo (barra branca).(2)</i>	13
<i>Figura 6 Níveis salivares de α-syn total (A), α-syn olig (B) e rácio α-syn olig/α-syn total (C) nos pacientes com DP (barra preta) e controlo saudável (barra branca). Correlação negativa entre α-syn total e α-syn olig nos pacientes com DP (D).(40)</i>	20
<i>Figura 7 Alterações nos níveis salivares de DJ-1 nos diferentes estados da escala de Hoehn e Yahr (A) e subtipos clínicos da DP (B).(62)</i>	23
<i>Figura 8 Comparação dos níveis salivares de CgA nos pacientes com ELA terminal, ELA moderada, demência vascular e controlo saudável.(64)</i>	27

1 Introdução

1.1 A Saliva e seu Potencial como meio de Diagnóstico

A saliva constitui um fluido corporal bastante atrativo para o diagnóstico de inúmeras doenças bem como para o acompanhamento da sua evolução, por várias razões: é um fluido sensível às alterações metabólicas, a sua recolha é económica, segura, não invasiva, não provoca qualquer dor e é mais fácil e acessível comparativamente à recolha de sangue e CSF (fluido cérebroespinal). Além disso, a saliva é um fluido que contém diversas proteínas e outras biomoléculas na sua constituição, sendo que o seu estudo e caracterização pode prover biomarcadores úteis para diferentes condições patológicas.(1, 2)

É um dos fluidos corporais mais versáteis e complexos, que apresenta diversas funções fisiológicas, atuando no processo digestivo, fisiologia esofágica, lubrificação oral e na proteção de células gástricas e cavidade oral de fatores externos como vírus e bactérias, por digestão e inibição do seu crescimento. A saliva é composta por aproximadamente 2000 proteínas e péptidos, sendo que 597 dessas são observadas também no sangue.(3) Tem demonstrado um grande potencial para diagnóstico e acompanhamento clínico de doenças hereditárias, neoplasias, doenças autoimunes e doenças orais como a doença periodontal e cárie.(4)

Testes salivares são realizados nas mais variadas áreas como a endocrinologia, diagnóstico de doenças infecciosas (infecções por HIV, por exemplo), toxicologia (detecção de álcool e drogas), medicina forense, análises hormonais e doseamentos enzimáticos.(5, 6) A saliva é também utilizada na medição dos níveis de cortisol (hormona considerada um biomarcador de stress) mas também dos níveis de androgénios, oxitocina e alfa amilase.(7)

A saliva é produzida por 3 tipos diferentes de glândulas salivares: Parótida, Submandibular e Sublingual. O processo de secreção salivar é regulado pelo sistema nervoso autónomo onde os ramos do sistema nervoso simpático e parassimpático inervam as glândulas salivares. Estas recebem inputs diretos da corda espinhal torácica superior (ramo simpático) e dos gânglios salivares primários localizados no tronco cerebral (ramo parassimpático) que regula a mastigação e a sensação, bem como o sabor.(8) A estimulação por parte do sistema nervoso simpático aumenta a secreção de proteínas salivares e a estimulação parassimpática aumenta o fluxo salivar. Portanto, atesta-se um padrão de resposta diverso gerado pelas glândulas salivares resultante das interações potenciais entre estes dois sistemas.(8, 9)

Adicionalmente, aceita-se que a função glandular é influenciada e modulada pelo estado emocional, evidenciando a ocorrência de comunicações entre estruturas neuronais superiores e glândulas salivares. Esta teoria é apoiada por estudos realizados em animais onde a estimulação cerebral de áreas específicas originou alterações no fluido oral. Estudos histológicos também suportam esta teoria na medida que comprovaram que os centros salivares simpáticos primários recebem inputs de um conjunto de células localizadas no mesencéfalo e prosencéfalo. O núcleo central da amígdala, núcleos da estria terminal e os núcleos paraventricular e lateral do hipotálamo constituem estes centros principais no prosencéfalo. Estas áreas são conhecidas por estarem envolvidas na resposta fisiológica relacionada com a ansiedade (estria terminal, por exemplo), medo (amígdala) e na criação e coordenação de respostas ao stress.(8)

Os sintomas de stress são induzidos pelo sistema nervoso simpático e pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Sendo assim, a saliva poderá, potencialmente, ser considerada um bom material para a investigação de condições de stress e ansiedade.(9)

Os vários constituintes salivares que integram a saliva passam por diferentes processos bioquímicos: síntese local de proteínas pelas glândulas salivares (ex. alfa amilase), difusão passiva de moléculas provenientes do plasma ou soro (ex. cortisol), transporte ativo (ex. imunoglobina A), ultrafiltração (ex. sulfato de

dehidroepiandrosterona) e através de locais de inflamação e dano tecidual (ex. citocinas, via fluido crevicular). No entanto, a maior parte dos constituintes integra a saliva através da síntese local pelas glândulas salivares e difusão passiva para o meio extracelular.(3, 8)

De uma maneira geral, apenas moléculas livres conseguem entrar no fluido salivar por difusão. Devido a isso, as concentrações destes constituintes no fluido salivar representam normalmente concentrações biologicamente ativas.(8)

As hormonas esteroides estão entre os vários constituintes que entram na cavidade oral por via do soro ou plasma sanguíneo e podem refletir a atividade do SNC (sistema nervoso central). As hormonas esteroides são sintetizadas pelas glândulas suprarrenais e gónadas sexuais, estruturas reguladas pela glândula pituitária e pelo hipotálamo. Os seus recetores estão distribuídos por várias regiões no nosso cérebro, nomeadamente no hipocampo, sendo que estas podem constituir marcadores úteis como reflexo da atividade cerebral.(8) Hormonas como o cortisol, progesterona e testosterona são exemplos de hormonas esteroides que podem ser encontradas no fluido oral (7, 8) e cujos valores se correlacionam com os correspondentes níveis sanguíneos. Outros constituintes bioquímicos como neuropéptidos (ex. substância P) e fatores neurotróficos (ex. fator de crescimento neural) também se correlacionam positivamente com os níveis encontrados no plasma sanguíneo.(8)

As principais classes de proteínas encontradas na saliva são: proteínas ricas em prolina, mucinas, alfa amílase (proteína mais abundante), cistatinas salivares, histatinas, péptido P-B e estaterina. Em menor percentagem temos as lipocalinas (secretadas pelas glândulas minor), timosinas beta e alfa-defensinas (estas atingem a saliva principalmente através do fluido crevicular). É comum ocorrerem modificações pós-translacionais (PTM'S) nas proteínas salivares, nas quais se incluem processos de fosforilação, glicosilação e clivagem proteolítica.(1) Estas ocorrem por ação de enzimas que são comuns a outras glândulas endócrinas e exócrinas e podem refletir PTM's encontradas em proteínas segregadas no geral, nas quais se incluem as proteínas secretadas pelo cérebro. Sendo assim, disfunções sistémicas e do SNC que afetam os processos envolvidos nas PTM's

podem ser identificadas através de uma análise qualitativa e quantitativa de PTM's nas proteínas salivares.(1, 7)

Portanto, o estudo da saliva como uma fonte de potenciais biomarcadores e, consequentemente, como potencial meio de diagnóstico tem permitido criar oportunidades únicas para a exploração de diferenças individuais nos mais variados processos biológicos relacionados com distúrbios psiquiátricos, aprendizagem, memória e mais recentemente, relacionados com as doenças neurodegenerativas.(8)

As doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Huntington são um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma perda seletiva e progressiva de sistemas neuronais fisiologicamente ou anatomicamente relacionados.(10) A identificação de biomarcadores para doenças neurodegenerativas tem-se mostrado potencialmente relevante para o seu diagnóstico, particularmente em fases iniciais, no acompanhamento de progressão da doença, bem como na avaliação da resposta do paciente face ao tratamento e intervenções terapêuticas.(10, 11)

Moléculas encontradas no cérebro humano e que são relevantes para a função do SNC também foram identificadas na saliva humana. Proteínas de caráter patológico também foram identificadas na saliva, como por exemplo as proteínas DJ-1 e *α -sinucleína*, relacionadas à doença de Parkinson, a proteína *tau hiperfosforilada* e proteína *beta amiloide* (A β 42), que estão associadas à doença de Alzheimer e a *cromogranina A* associada à esclerose lateral amiotrófica.(7, 12) Adicionalmente, os *micro-RNAs* começam a ser consideradas como candidatos potencialmente atrativos no diagnóstico de várias doenças, nomeadamente doenças que afetam o SNC.(13, 14)

Resumindo, os biomarcadores salivares podem apresentar grande importância no diagnóstico de doenças neurodegenerativas, bem como no diagnóstico de exclusão de outras doenças de caráter neurológico e condições não psiquiátricas.(7, 15)

2 Materiais e Métodos

A pesquisa de artigos de interesse para a realização desta revisão bibliográfica foi realizada na base de dados da *PubMed*. As palavras chave utilizadas foram as seguintes: “neurodegenerative diseases and salivary biomarkers”, “Alzheimer's disease and saliva”, “Parkinson's disease and saliva”, “Amyotrophic lateral sclerosis and saliva”, “Lactoferrin Alzheimer's”, “Cortisol Parkinson's”, “Albumin periodontitis”, “Alzheimer's A β 42”, “Salivary synuclein Parkinson's disease”. Nos critérios de inclusão foram selecionados os artigos escritos nos últimos 10 anos, disponíveis online em opção *full text*, e estudos envolvendo humanos que associassem doenças neurodegenerativas, saliva e biomarcadores.

3 Doenças Neurodegenerativas

3.1 Doença de Alzheimer

O aumento da idade média da população mundial está associado um sério problema e ameaça à saúde: as demências. A forma de demência mais comum é a doença de Alzheimer (DA) correspondente a cerca de 50% de todos os pacientes com demência.(16) Atinge aproximadamente 30 milhões de pessoas mundialmente sendo que este número está previsto triplicar nos próximos 20 anos, segundo a organização mundial de saúde. O exato diagnóstico e tratamento das patologias demenciais surge como um problema cada vez mais sério, constituindo uma importante limitação na atuação dos sistemas de saúde dos países desenvolvidos e acarretando elevados custos económicos.(17)

A DA é uma doença de carácter neurodegenerativo, associada à deterioração de funções cognitivas superiores e perda progressiva de memória.(14) É uma doença caracterizada pela acumulação e deposição de placas de proteína β -amilóide e agregados de proteína tau no cérebro.(2, 16, 18) A acumulação de proteína β -amilóide, nomeadamente no hipocampo e a alteração da proteína tau levam à formação de agregados neurofibrilares estando associado a um declínio cognitivo.(19)

O diagnóstico da DA é largamente baseado em testes psicológicos e avaliações clínicas, após a exclusão de outras causas patológicas. No geral, o diagnóstico não é realizado até estar presente um significativo grau de demência.(6, 20) É uma doença sem cura, para a qual existem atualmente poucos biomarcadores de diagnóstico. O diagnóstico clínico e a diferenciação entre as demências como a DA, demência vascular e demência frontotemporal é algo difícil de realizar. Apesar de recentemente serem utilizados métodos imagiológicos como ressonância magnética e tomografia por emissão de positrões, que proporcionam um diagnóstico mais rápido e preciso, a descoberta de biomarcadores que antecipassem e fundamentassem o diagnóstico clínico e a distinguissem de outras causas de défice cognitivo iria seguramente melhorar a relevância e qualidade do diagnóstico.(6, 16-18) Tal poderia permitir o

reconhecimento e diagnóstico da doença no seu estado mais precoce e levar à elaboração do melhor plano de tratamento ou até modificação deste com base nas características individuais de cada paciente. (18)

Até à data existem 3 biomarcadores quantificados no CSF que podem ser potencialmente usados para o diagnóstico da DA: proteína β -amilóide ($A\beta$), proteína tau total (T-tau) e proteína tau fosforilada (P-tau). Diminuição dos níveis de β -amilóide 1-42 ($A\beta_{42}$) em combinação com um aumento dos níveis de proteína tau total e proteína tau fosforilada no CSF têm vindo a ser considerados biomarcadores sensíveis, precisos e diferenciais para o diagnóstico da DA, mesmo num estado precoce.(2, 13, 16, 20)

3.1.1 Biomarcadores salivares

3.1.1.1 Proteína T-tau (tau total) e proteína P-tau (tau fosforilada)

A proteína tau está crucialmente envolvida na patogénese da DA sendo que a sua forma hiperfosforilada foi reportada como de relevância para a formação de agregados neurofibrilares.(20)

A proteína tau pode ser segregada pelas células neuronais para o espaço extracelular.(21) Devido à proximidade do SNC com as glândulas salivares é bem possível que estas espécies sejam libertadas nos nervos que inervam as glândulas salivares. Adicionalmente, mRNA codificante para esta proteína aparenta ser altamente expresso nas glândulas salivares.(22) O CSF também pode comunicar com compartimentos periféricos ao longo dos nervos cranianos.(23)

Num estudo realizado recorrendo a espectrometria de massa e imunoprecipitação, a proteína tau foi identificada e quantificada em amostras de saliva. Os níveis totais de proteína tau salivar (t-tau) tendiam a diminuir nos pacientes com DA comparativamente ao grupo de controlo, no entanto, esta

diferença diminuiu quando os valores obtidos foram normalizados pelos níveis totais de proteínas salivares.(20)

Identificou-se uma tendência clara para um aumento dos níveis de proteína tau, na sua forma fosforilada (p-tau), nos pacientes com DA (20, 24) quer normalizando com os níveis de proteínas salivares totais ou não (*Figura 1*). (20) A proporção p-tau/t-tau aumentou significativamente nos pacientes com DA comparativamente ao grupo de controlo constituído por indivíduos saudáveis.(7, 20) Tal pode sugerir que a forma fosforilada seja de relevância para o desenvolvimento e mesmo progressão da doença.(20, 25) Foi possível distinguir o grupo composto por indivíduos com DA do grupo de controlo constituído por indivíduos saudáveis. Esta descoberta é relevante na medida em que a proteína tau parece ser um potencial biomarcador para o diagnóstico e progressão da doença, bem como na monitorização da resposta do paciente face ao tratamento farmacológico.(20)

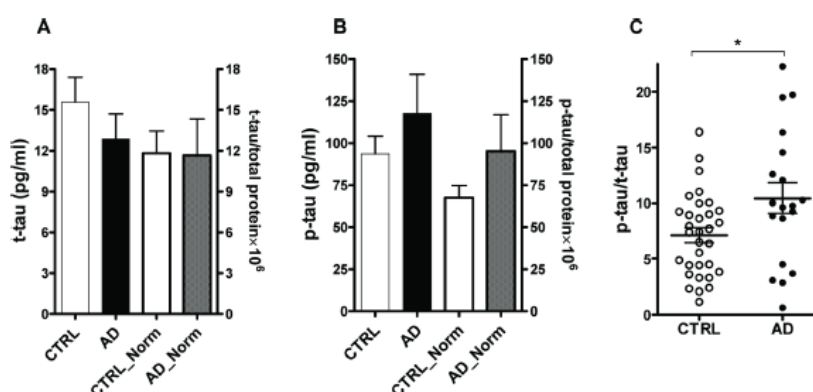


Figura 1 Níveis salivares de t-tau (A), p-tau (B) e proporção p-tau/t-tau (C) nos pacientes com DA e controlo saudável.(20)

3.1.1.2 A β -42

A presença de placas extracelulares compostas pela proteína A β (β -amilóide) constitui uma das principais características patológicas da DA. A proteína A β é um péptido constituído por 39-42 aminoácidos formado pela clivagem proteolítica da proteína amilóide precursora (APP) pelas γ e β

secretases, sendo que as duas principais isoformas desta proteína são a A β -40 e A β -42. Tem sido demonstrado que a A β -42 promove a agregação e fosforilação da proteína tau, e é mais propensa à agregação e formação de placas. Constitui a isoforma mais patogénica comparativamente à A β -40.(26)

A proteína percussora A β 42 foi reportada como sendo expressa nas células epiteliais salivares.(15, 27) Um estudo identificou a presença de A β 40 e A β 42 em amostras salivares e constatou que os níveis salivares de A β 42 foram superiores no grupo constituído por indivíduos com DA comparativamente ao grupo de controlo saudável e mesmo em relação ao grupo constituído por indivíduos com doença de Parkinson (*Figura 2*). (15)

Group	A β_{42} (pg/ml)	A β_{40} (pg/ml)	No. of subjects
AD patients	6.81 \pm 20.04	22.3 \pm 4.88	70
Mild	7.67 \pm 16.25*	21.87 \pm 5.7	29
Moderate	11.70 \pm 34.76	21.5 \pm 4.17	24
Severe	3.03 \pm 3.49	23.92 \pm 4.55	17
PD patients	3.66 \pm 4.21	26.41 \pm 5.12	51
Control subjects	2.89 \pm 4.96	20.82 \pm 5.55	56

AD = Alzheimer's disease; PD = Parkinson's disease. Values are mean \pm SD. *p < 0.05 versus control subjects

Figura 2 Concentrações salivares de A β 42 nos pacientes com doenças neurodegenerativas e controlo saudável. (15)

Esta diferença foi significativamente elevada nos indivíduos em estado leve e moderado da DA, o que sugere que se pode tratar de uma característica específica para a DA, ausente na doença de Parkinson. Relativamente aos indivíduos num estado avançado da doença, associado a maior neurodegeneração, os valores encontravam-se inalterados e semelhantes aos valores do grupo de controlo. Tal pode ser devido à perda de neurónios que produzem APP, acumulação cerebral de A β e/ou uma diminuição no clearance de A β . (15)

O mecanismo pelo qual é possível detetar a proteína A β 42 no fluido oral não é claro. Uma das explicações propostas é que esta possa ser libertada pelas glândulas salivares via processamento de APP por enzimas presentes nas células salivares epiteliais. No entanto, no estudo prévio foi possível distinguir os

indivíduos com DA dos grupos de controlo e de indivíduos com doença de Parkinson, o que demonstra o potencial da proteína A β 42 como biomarcador para o diagnóstico precoce da doença. (15)

3.1.1.3 Lactoferrina

A lactoferrina constitui uma das principais proteínas antimicrobianas presentes na nossa saliva, sendo um elemento defensivo importante face a bactérias, leveduras, fungos, vírus e protozoários. Esta liga-se ao ferro, mas também à proteína β -amilóide, encontrando-se fortemente correlacionada com a DA.(5) Evidencia-se que o recetor para a lactoferrina encontra-se elevadamente expresso nos neurónios e capilares associados a doenças neurodegenerativas.(28)

Os níveis de lactoferrina presentes na saliva demonstraram ser significativamente mais baixos nos pacientes com MCI (défice cognitivo progressivo) e DA comparativamente aos indivíduos saudáveis (*Figura 3*). Consequentemente, nesse estudo este biomarcador permitiu classificar e distinguir os pacientes com MCI/DA dos indivíduos de controlo. (5)

Variable	Control	AD	P value
n (F/M)	68 (43/25)	59 (44/15)	ns
Age (years)	69.53 \pm 8	80.07 \pm 7.6***	<.001
APOE ϵ 4 carriers	17.64%	49.15%**	<.01
CSF total tau (pg/mL)	250.71 \pm 195.87	650.56 \pm 469.71**	<.01
CSF A β ₄₂ (pg/mL)	983.05 \pm 461.83	366.97 \pm 163***	<.001
Saliva lactoferrin (μ g/mL)	10.24 \pm 1.96	4.78 \pm 1.11***	<.001

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; F, female; M, male; ns, not significant; CSF, cerebrospinal fluid.

NOTE. Age data are expressed as mean \pm SD. Biomarkers data are expressed as median (interquartile range). ** P < .01, *** P < .001 versus control group.

Figura 3 Concentrações salivares de Lactoferrina e concentrações de t-total e A β 42 no CSF nos pacientes com DA e controlo saudável.(5)

A diminuição dos níveis salivares de lactoferrina ocorre já no processo “pré-clínico” da DA, numa fase mais tardia e onde aparece um défice cognitivo subtil. Esta proteína tem, por isso, potencial para ser considerada um bom biomarcador

para o diagnóstico de MCI/DA e na identificação de indivíduos “aparentemente saudáveis”, mas já numa fase pré-clínica de DA ou mesmo com MCI, não diagnosticados.(5)

Verificou-se que as concentrações salivares de lactoferrina em pacientes com doença de Parkinson eram superiores às do grupo de controlo, o que torna a diminuição observada nos pacientes com DA potencialmente diferenciadora desta patologia. A lactoferrina mostrou também ter uma correlação significativa com biomarcadores presentes no CSF como as proteínas A β -42 e tau total (Figura 4).(5)

Correlations			
Biomarkers	Saliva lactoferrin	CSF A β ₄₂	CSF total tau
Saliva lactoferrin	1	0.688***	-0.601***
CSF A β ₄₂	0.688***	1	-0.529***
CSF total tau	-0.601***	-0.529***	1

Abbreviations: CSF, cerebrospinal fluid; AD, Alzheimer's disease.
NOTE. *** $P < .0001$.

Figura 4 Correlação entre os níveis de lactoferrina salivar e os níveis de A β 42 e t-total no CSF nos pacientes com DA e controlo.(5)

3.1.1.4 Metabolitos salivares

A taurina constitui um agonista dos recetores de glutamato e assume um papel potencialmente neuroprotetor na medida em que parece prevenir a neurotoxicidade da proteína A β (29), podendo ser relevante na patofisiologia da DA. Foram observados níveis reduzidos de taurina em pacientes com demência (Figura 5), nos quais se incluem pacientes com DA.(2)

O acetato é um metabolito que está envolvido em vias como a glicólise, no metabolismo do piruvato e na β -oxidação e constitui uma das moléculas afetadas na via da taurina e hipotaurina. Aparentemente este encontra-se em níveis elevados nos pacientes com demência face ao controlo (Figura 5).(2)

A histamina é um neurotransmissor que faz parte do sistema histaminérgico, um sistema conhecido pela sua influência e alterações em doenças

neuropsiquiátricas como a DA. Apresenta concentrações aumentadas nos pacientes com demência (*Figura 5*). (2, 30)

O succinato está envolvido em vias como o ciclo de Krebs e do ácido γ -aminobutírico (GABA), ambas de relevo na DA. Foram detetados níveis reduzidos deste metabolito em indivíduos com demência (*Figura 5*), o que pode sugerir alterações nestas vias, ou na sua regulação. (31) Níveis reduzidos de succinato também tinham sido anteriormente reportados no CSF de pacientes com DA. (2, 32)

O glicerol está envolvido no metabolismo de acilgliceróis. Foram observados níveis reduzidos de glicerol em pacientes com DA (*Figura 5*), o que pode sugerir alterações ao nível da lipólise/lipogénese. Na realidade, alterações no metabolismo lipídico foram anteriormente reportadas em pacientes com demência. (2, 33)

O sulfato de dimetilo e o propionato são dois constituintes que se originam a partir da dieta, da digestão de hidratos de carbono ou da microbiota intestinal. Foram constatados níveis reduzidos de sulfato de dimetilo nos indivíduos com demência, ao contrário do propionato, onde foram observados níveis aumentados (*Figura 5*). (2, 18) A deterioração da saúde periodontal nos pacientes com demência, nos quais se inclui a DA, já tem sido reportada em vários estudos. (34, 35) Sendo assim, estes resultados podem refletir as diferenças na saúde oral entre os indivíduos saudáveis e os com demência e não necessariamente evidenciar consequências diretas a doença. (2)

Outros metabolitos como a galactose, imidazole, acetona, creatinina e 5-aminopentanoato também mostraram ser potencialmente úteis como biomarcadores. Foram identificadas concentrações reduzidas de galactose em indivíduos com MCI comparativamente aos indivíduos de controlo, bem como concentrações aumentadas de imidazole, acetona, creatinina e 5-aminopentanoato nas amostras salivares de pacientes com DA relativamente aos indivíduos saudáveis. (18)

O facto de estes metabolitos presentes no fluido oral permitirem distinguir indivíduos saudáveis de indivíduos com demência e constatando a associação

de alguns destes com vias afetadas na demência, atesta o potencial valor do seu uso como biomarcadores.(2, 18)

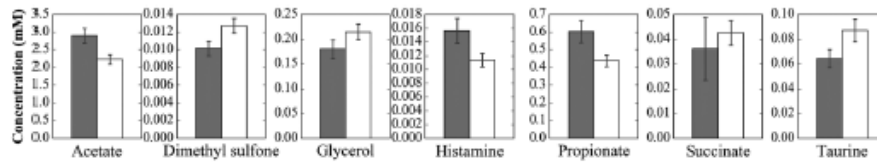


Figura 5 Concentrações dos 7 metabólitos com importância significativa na distinção de pacientes com demência (barra cinza) e o controle (barra branca).(2)

3.1.1.5 Trealose

Os açúcares assumem um papel de relevância no metabolismo e estão associados a um repertório de mudanças/adaptações metabólicas e fisiológicas no organismo. Assim, a concentração destes no fluido oral pode estar associada à patogénese de várias doenças.(24)

Os níveis de açúcar salivar, nomeadamente os níveis de trealose nos pacientes com doença de Alzheimer evidenciaram ser superiores aos níveis presentes nos indivíduos controle (saudáveis) e com doença de Parkinson. Permitiram a clara distinção entre os 3 grupos. (24)

3.2 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa crônica progressiva que é acompanhada por disfunções e alterações autônomas em diferentes mecanismos reguladores.(11, 36) Constitui a 2º doença neurodegenerativa mais prevalente e afeta aproximadamente entre 1 a 4% da população que se encontra entre os 60 e 80 anos. Mundialmente encontram-se entre 4,1 a 4,6 milhões de indivíduos afetados pela doença.(37) Está previsto este número aumentar para além do dobro em 2030, à medida que a população envelhece e a esperança média de vida aumenta.(38)

A DP é caracterizada por uma degeneração no sistema nervoso autónomo, central e periférico associada à formação de corpos de Lewy.(39) Os corpos de Lewy consistem em agregados insolúveis de proteínas que contêm a proteína α -sinucleína (α -syn) como seu principal componente.(38, 40)

Clinicamente pode ser caracterizada por uma síndrome motora com disfunções motoras associadas, como tremores em repouso, rigidez e bradicinesia. Estes sintomas motores estão relacionados com a desinervação dopaminérgica na substância negra, associada à formação de corpos de Lewy.(39, 41) Surgem também com frequência sintomas não motores como dor, alterações de humor, disfunções do sistema nervoso autónomo, distúrbios do sono, cansaço, apatia, instabilidade (hipotensão), anorexia, disfunção cognitiva e depressão.(36, 37) À medida que a doença progride estas complicações motoras e não motoras tornam-se cada vez mais graves.(36)

A causa da DP aparenta ser de carácter multifatorial, com a intervenção de fatores genéticos e ambientais. Evidencia-se estarem envolvidos uma grande diversidade de mecanismos da doença como o stress oxidativo, degradação e agregação de proteínas, inflamação, autofagia desregulada e disfunção mitocondrial.(38)

O diagnóstico da DP é nomeadamente baseado em critérios clínicos e exames físicos, onde a componente subjetiva não pode ser eliminada e a precisão de diagnóstico, particularmente em estado precoce, aparenta ser baixa.(38, 40, 42)

O facto de a DP assumir um perfil cognitivo, sintomático e neuropatológico semelhante a outras patologias neurodegenerativas, não facilita o seu diagnóstico e diferenciação.(37)

Atualmente são usadas técnicas imagiológicas que são úteis, mas, no entanto, acarretam um elevado custo e não fazem distinção das diferentes síndromes associadas à DP. (42) O exame de diagnóstico definitivo para a confirmação da doença é realizado na autópsia, onde se atesta a degeneração de neurónios dopaminérgicos na substância negra e se identifica a presença de corpos de Lewy.(37)

Os pródromos da doença podem-se iniciar bastantes anos antes do seu diagnóstico o que constitui uma oportunidade para a sua identificação na fase mais precoce.(43) Quando os pacientes obedecem aos critérios clínicos para a DP e constata-se a presença dos sintomas motores, por volta de 70% dos neurónios dopaminérgicos localizados em algumas partes da substância negra podem já ter degenerado. Sendo assim, a realização de um diagnóstico precoce preciso para a doença é consideravelmente necessário.(38)

Fluidos como CSF, sangue, urina, plasma, saliva têm demonstrado um grande potencial na investigação e descoberta de biomarcadores.(42) Alguns potenciais biomarcadores para a DP são os seguintes: proteína deglicase (DJ-1), α -sinucleína (α -syn), β -amilóide($a\beta$), tau e glutathione,(37) sendo a α -syn e a proteína DJ-1 as mais testadas.(11)

A patologia de corpos de Lewy já foi identificada em células das glândulas salivares minor e submandibular, o que atesta o valor prático da saliva para a descoberta de potenciais biomarcadores.(44-46) A sua identificação pode permitir melhorar o diagnóstico e ser essencial no acompanhamento da doença, no desenvolvimento do melhor plano de tratamento e intervenção terapêutica.(11, 38)

3.2.1 Secreção salivar

3.2.1.1 Hiposialorreia

A redução de secreção salivar constitui uma manifestação nos pacientes de Parkinson(47, 48) não só em estágio avançado, mas também num estado precoce da doença.(48) Sendo que o processo de salivação é controlado pelos ramos simpático e parassimpático do sistema nervoso,(47) alterações neste processo podem estar associadas a uma disfunção autónoma.(48, 49)

Uma possível explicação para isso é a deficiência dopaminérgica. Estudos em animais mostraram que a dopamina modula a secreção salivar. Um estudo realizado em ratos constatou que a ativação periférica e central dos recetores dopaminérgicos produziram secreção salivar.(47)

Num estudo realizado foi verificado que quer a secreção basal quer a reflexa estavam diminuídas nos pacientes com DP comparativamente ao grupo controlo saudável, sugerindo que existe uma redução no input neuronal nas glândulas salivares.(48)

A patologia de Lewy foi identificada em células das glândulas submandibulares e estruturas anatomicamente relacionadas em indivíduos diagnosticados com DP e com doença de corpos de Lewy incidente. (46, 49) Esta patologia poderá contribuir para o volume salivar reduzido na DP quer na salivação estimulada quer em repouso e se traduzir num desequilíbrio na secreção normal sero-mucosa das glândulas submandibulares.(49)

3.2.1.2 Drooling

Na doença de Parkinson *drooling* é considerado um sintoma não motor(47) e este excesso de saliva que encontramos nestes pacientes não é devido à sua secreção aumentada, tal como já foi constatado anteriormente, mas sim devido à inaptidão de a engolir e ao fracasso em reter a saliva na cavidade oral. Isto pode ser devido a um retardamento da musculatura volitiva perioral e facial (hipocinesia, bradicinesia) responsável pela mobilização da saliva na boca. (49)

3.2.1.3 Concentração de Proteínas

Foi constatada uma maior concentração de proteínas salivares no grupo PD comparativamente ao grupo de controlo. Nomeadamente a concentração da enzima amílase e albumina foi superior nos pacientes com DP, tendo sido observada uma correlação positiva quer com a concentração total de proteínas quer com a concentração de DJ-1. A amílase é a proteína mais abundante na saliva e é sintetizada pelas 3 glândulas salivares major, sendo que este aumento pode sugerir uma secreção anormal por parte destas glândulas.(50)

O principal mecanismo pelo qual a albumina entra na cavidade oral é através de ultrafiltração do soro e sua concentração salivar pode também refletir o estado periodontal e integridade da mucosa. Concentrações aumentadas de albumina foram encontradas em indivíduos com gengivite e periodontite.(51) Constata-se que de uma maneira geral, indivíduos com DP têm uma pobre saúde periodontal e uma alta prevalência de doença periodontal comparativamente com os indivíduos de controlo.(52) Assim, este aumento de concentração salivar pode ser devido às condições periodontais pobres nestes indivíduos, e não resultado direto da doença.(50)

No entanto, uma hipótese para o aumento da concentração de proteínas salivares pode ser devido a uma disfunção autónoma, característico na DP, associado aos corpos de Lewy que já foram identificados quer nas glândulas

salivares quer em várias localizações no sistema nervoso autónomo (SNA) relacionadas com a função glandular salivar. A secreção de proteínas está dependente de ativação simpática e parassimpática, e a atividade nos centros salivares localizados no cérebro pode modificar esta sinalização. Na medida que distúrbios no SNA precedem os sintomas motores, a disfunção glandular salivar pode constituir um biomarcador útil precoce da doença de Parkinson. (50)

3.2.2 Biomarcadores salivares

3.2.2.1 Alfa sinucleína (α -syn)

A α -syn é uma proteína acídica relativamente pequena constituída por 140 aminoácidos (14KDa) e que se encontra expressa nas terminações pré-sinápticas do sistema nervoso central.(37, 40) Pertence à família das sinucleínas, onde também se incluem as beta e gamma sinucleínas.(37)

Esta exerce um papel relevante na patogénese da DP sendo que constitui o maior componente dos corpos de Lewy.(37, 40) É predominantemente uma proteína intracelular e exerce um papel importante na modulação e estabilidade da membrana neuronal, estando também envolvida no tráfico membranar através de transporte vesicular e na sinalização pré-sináptica.(37)

Já foi identificada em fluidos biológicos como sangue, plasma, CSF e saliva.(37, 53, 54) CSF e a saliva são fluidos que estão em contacto com as fibras neuronais e, portanto, são ambos potencialmente afetados pela secreção de α -syn. Tal não acontece no soro. (40) Na saliva a fonte desta proteína ainda não é absolutamente compreendida. Esta pode ser secretada para a saliva pelos neurónios que inervam as glândulas salivares e/ou derivar do plasma.(11)

Foi também identificada a presença desta proteína nas fibras nervosas periféricas, tecido não neuronal, camada epitelial basal da bochecha e glândulas salivares minor. (40, 45) As glândulas salivares, nomeadamente a

submandibular, evidenciam ser candidatos promissores para a detecção de α -syn na DP e no seu diagnóstico.(37, 54) Estas estruturas revelaram resultados positivos e consistentes na detecção de α -syn nos pacientes com DP comparativamente com os indivíduos saudáveis.(37) Foi proposto que a glândula submandibular pode estar envolvida na sinucleinopatia em fases precoces na DP.(11)

A α -syn é expressa maioritariamente na sua forma monomérica (α -syn mon) sendo que em condições fisiológicas existe um equilíbrio entre a forma monomérica e oligomérica (α -syn olig), o que traduz a eficácia dos mecanismos de limpeza celular. Na DP ocorre uma alteração neste turnover, resultando na acumulação de α -syn olig extracelularmente e intracelularmente. (40) A forma oligomérica constitui a principal forma neurotóxica de α -syn, provocando a morte celular neuronal. (40, 54) Níveis elevados desta forma já foram verificados no cérebro de doentes com Parkinson e DLB (demência com corpos de Lewy) comparativamente aos indivíduos saudáveis. (40, 54)

Níveis salivares de α -syn total em pacientes com DP foram verificados como sendo inferiores comparativamente aos indivíduos saudáveis. (11, 40, 55) No entanto, foi constatado que os níveis salivares de α -syn na sua forma oligomérica foram significativamente superiores nos indivíduos com DP relativamente ao controlo. O rácio α -syn olig/ α -syn total foi também maior nos pacientes com DP (*Figura 6*). (40) Foi revelada uma correlação negativa entre os níveis salivares de α -syn total e o α -syn olig e uma correlação positiva entre o α -syn total salivar e a duração da doença. (40)

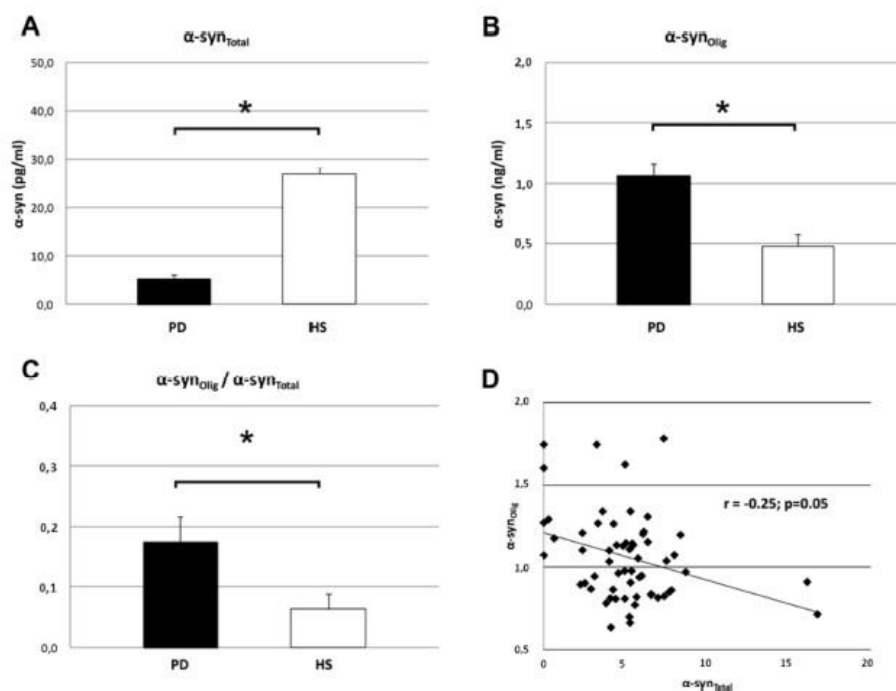


Figura 6 Níveis salivares de α -syn total (A), α -syn olig (B) e rácio α -syn olig/ α -syn total (C) nos pacientes com DP (barra preta) e controlo saudável (barra branca). Correlação negativa entre α -syn total e α -syn olig nos pacientes com DP (D). (40)

Comparando os níveis de α -syn com a pontuação motora da UPDRS (Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson) tal sugere uma correlação negativa entre os níveis de α -syn e a gravidade dos sintomas motores (11)

Estudos acerca da composição do CSF revelaram níveis de α -syn olig significativamente aumentados no grupo com DP comparativamente aos indivíduos saudáveis o que constata a utilidade do α -syn olig salivar como um potencial biomarcador da doença. (37, 56, 57)

A estrutura da α -syn pode ser modulada por fatores como o stress oxidativo, concentração de ácidos gordos, proteólise, fosfolípidos e iões metálicos. Modificações pós-translacionais também podem ocorrer e conduzir a alterações no tamanho e estrutura da proteína. (37)

Aproximadamente 90% da α -syn presente na composição dos corpos de Lewy está fosforilada na posição Ser-129 em contraste com os 4% de α -syn total que se encontra fosforilada no cérebro de um indivíduo saudável. (58) A fosforilação

na posição Ser-129 é característica da DP e sinucleinopatias relacionadas.(37) No plasma e no CSF os níveis de α -syn fosforilada encontravam-se aumentados nos pacientes com DP comparativamente ao controlo saudável. (37, 38)

A deteção de variações na α -syn, nomeadamente a sua forma fosforilada parece ser um biomarcador promissor para o diagnóstico da DP, bem como na sua diferenciação de outras patologias neurodegenerativas e correlação com a gravidade da doença.(37, 58)

3.2.2.2 Cortisol

O cortisol é uma hormona produzida pelo nosso corpo em situações de stress.(59) Pode constituir um biomarcador natural para o stress refletindo a função do eixo hipotalâmico-pituitário.(36)

Níveis maiores de cortisol já foram descritos na depressão, ansiedade, doença de Parkinson e Alzheimer.(60) A DP tem vários sintomas não motores potenciais para causar este tipo de reação de stress no portador, como já mencionado anteriormente. Consequentemente, estes podem resultar em alterações na secreção de cortisol.(36) O stress fisiológico é um problema frequente nesta doença e sugere a ocorrência de alterações no eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) nestes pacientes.(59)

Um estudo constatou níveis de cortisol salivar significativamente superiores em indivíduos com DP que não apresentavam comportamentos impulsivo-compulsivo (um subgrupo de pacientes com DP desenvolve este tipo de comportamentos) comparativamente ao grupo de controlo saudável. No entanto, diferenças não foram encontradas no grupo de pacientes que apresentava este tipo de comportamento impulsivo-compulsivo e o grupo de controlo.(60)

3.2.2.3 DJ-1

DJ-1 é uma proteína multifuncional, codificada pelo gene PARK7, que está envolvida em vários mecanismos fisiológicos como na função mitocondrial, transdução de sinal, regulação na transcrição e defesa antioxidativa. Trata-se de uma proteína celular abundante constituída por 189 aminoácidos e encontra-se predominantemente expressa no citoplasma, mas também no núcleo e mitocôndria.(61)

Assume um papel significativo na homeostase dos neurónios dopaminérgicos, participando no metabolismo da dopamina: aumenta a transcrição da tirosina hidroxilase (enzima limitante da síntese de dopamina) e ativa a síntese de dopamina através da interação com enzimas biossintéticas da dopamina (tais como as enzimas tirosina hidroxilase e a 4-diidroxi-l-fenilalanina descarboxilase).(61)

Foi demonstrada a sua presença no epitélio escamoso da bochecha, bem como no músculo subjacente, nervos, glândula submandibular e estruturas vasculares.(45) A fonte pelo qual a DJ-1 aparece na saliva ainda se mantém desconhecida, podendo ser secretada pelos nervos que inervam as glândulas salivares, CSF, plasma ou por troca de outros fluidos corporais. As glândulas salivares, nomeadamente as submandibulares, aparentam estar diretamente ligadas ao SNC e potencialmente envolvidas, portanto, nas fases precoces da DP.(11)

Um estudo constatou uma tendência de aumento de DJ-1 salivar nos pacientes com DP comparativamente ao grupo de controlo saudável.(11) Adicionalmente em outro estudo também foi verificada uma maior concentração salivar de DJ-1 nos pacientes com DP comparativamente ao controlo, no entanto, após um ajuste para a concentração total de proteínas verificaram que não havia diferenças entre os 2 grupos.(50) Constatou-se uma correlação entre a DJ-1 e a pontuação motora da UPDRS (Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson), atestando o valor útil de DJ-1 como biomarcador para a severidade da doença.(50)

Os níveis de DJ-1 salivar podem também constituir um bom indicador para a progressão da doença como biomarcador na avaliação da função dopaminérgica nigroestriatal. Foram observadas diferenças significativas nas concentrações salivares de DJ-1 nos diferentes subtipos clínicos e estados da DP. Os níveis salivares de DJ-1 na fase avançada de DP foram significativamente superiores aos níveis constatados na fase precoce da doença. Resultados similares foram também verificados no plasma.(62)

Mais especificamente, os níveis de DJ-1 salivar nos pacientes que se encontram na etapa IV da escala de Hoehn e Yahr (estado avançado da doença) foram superiores aos níveis presentes na etapa I-III da escala de Hoehn e Yahr (estado inicial), bem como também superiores comparativamente ao controlo (*Figura 7*). (38, 62) Este aumento de DJ-1 na saliva e plasma parece refletir um aumento do stress oxidativo nas fases mais avançadas da doença atestando o potencial desta proteína como biomarcador na monitorização de progressão da doença.(62)

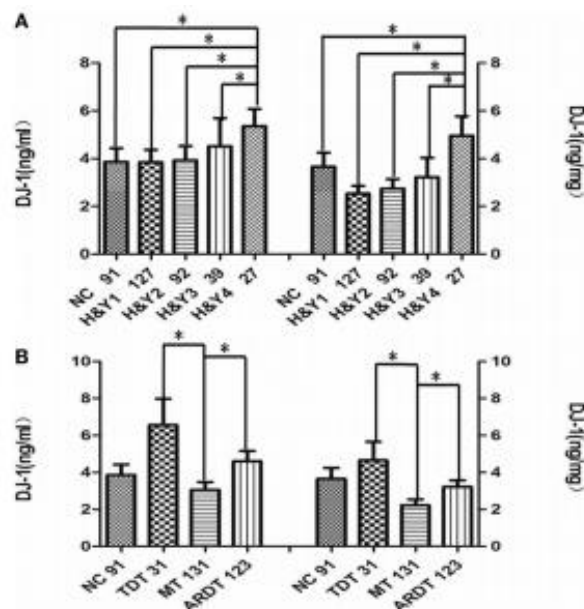


Figura 7 Alterações nos níveis salivares de DJ-1 nos diferentes estados da escala de Hoehn e Yahr (A) e subtipos clínicos da DP (B).(62)

Diferenças nas concentrações salivares em diferentes subtipos clínicos de DP também foram verificadas (*Figura 7*). Foi descoberto que os níveis salivares de DJ-1 diminuíram significativamente nos pacientes com MT (tipo “misto”) comparativamente aos pacientes com TDT (tipo tremor dominante) e ARDT (tipo acinético-rígido).(62)

Recorrendo a anticorpos monoclonais específicos para a DJ-1 oxidada na posição cys-106 foi predominantemente identificada a sua presença na neuromelanina, contendo processos e comunicações neuronais da substância negra, nos neurónios e células da glia nos núcleos vermelhos, nos núcleos olivares inferiores e nos astrócitos no corpo estriado. Todas estas estruturas estão associadas com a regulação do movimento. (38)

Assim, não só a quantificação de DJ-1, mas também as pesquisas de alterações estruturais, como a sua oxidação, podem servir como biomarcadores úteis para o diagnóstico da DP.(38, 61)

3.3 Esclerose lateral amiotrófica

A Esclerose lateral amiotrófica (ELA) constitui uma doença neurodegenerativa progressiva, sem cura ou tratamento médico efetivo caracterizada pela perda e degeneração de neurónios motores inferiores e superiores na medula espinhal e cérebro.(40, 63-65) A incidência da doença é de 1-2 por 100,000 indivíduos,(65) sendo que a sua etiologia permanece desconhecida.(66)

O início da doença dá-se por volta dos 50-70 anos, sendo o pico da incidência aos 60 anos. O sexo masculino é o mais afetado. A esperança média de vida para estes pacientes após o estabelecimento da doença é de aproximadamente entre 2-5 anos.(12)

É uma doença complexa, de grande heterogeneidade, à qual estão associados inúmeros mecanismos patológicos tais como: disfunção mitocondrial, degeneração axonal, stress oxidativo, inflamação, ativação da microglia, agregação de proteínas e cito toxicidade.(63)

Relativamente à heterogeneidade clínica da ELA esta pode ser classificada em 8 fenótipos distintos: bulbar, clássico, *flail leg*, *flail arm*, respiratório, piramidal, neurónio motor inferior puro e neurónio motor superior puro.(12) Nesta doença ocorre a deposição de inclusões neuronais descritas como corpos de Bunina, que se parecem ser inclusões hialinas semelhantes aos corpos de Lewy.(12)

A ELA afeta o trato corticoespinhal, o tronco cerebral e os neurónios do corno anterior da medula espinhal resultando em sintomas motores nervosos periféricos e centrais.(12) Os pacientes exibem atrofia muscular e perdem a função respiratória à medida que a doença progride.(63) Fraqueza nos músculos bulbares (disartria, hipofonia) e membros com atrofia, perda de peso, espasticidade muscular, constituem alguns dos sintomas motores da doença.(65)

O diagnóstico clínico é baseado nos critérios revisados de *El Escorial* e *Awaji*. Métodos imagiológicos como ressonância magnética também podem constituir uma ferramenta útil na deteção de alterações na matéria branca e cinzenta

relacionadas com a ELA.(12) A heterogeneidade da doença e o envolvimento de inúmeros fatores ambientais e genéticos complica o diagnóstico bem como a pesquisa de biomarcadores específicos que seriam de grande valor no diagnóstico precoce.(12, 63) A confirmação do diagnóstico demora cerca de 12 meses e por essa altura o paciente já apresenta um déficit funcional significativo. A morte destes pacientes ocorre na maior parte dos casos devido a falência respiratória.(12, 65)

Atualmente o único fármaco utilizado no tratamento é o *riluzole*, um bloqueador da liberação do glutamato que estende a vida do paciente entre 2 a 3 meses.(63).

3.3.1 Secreção salivar

3.3.1.1 Drooling

A perda não intencional de saliva ocorre em cerca de 25% dos pacientes com ELA. No entanto, constatou-se que estes sintomas não ocorrem devido a uma secreção salivar aumentada nestes pacientes, mas sim à incapacidade de engolir devido à espasticidade da língua, fraqueza muscular dos músculos da boca, face e faríngeos e à perda da função orofaríngea bem como de coordenação muscular.(65) Consequentemente, resulta na acumulação e derrame da saliva para fora da cavidade oral.(66) Constitui um fator de desconforto para o paciente, podendo originar problemas como irritação da pele, infecção, afetando também a qualidade de sono e da voz. Estes sintomas aumentam a fadiga, levam ao isolamento social e constrangimento, influenciando significativamente a qualidade de vida nestes pacientes.(65, 66)

3.3.2 Biomarcadores salivares

3.3.2.1 Cromogranina A (CgA)

A cromogranina A é uma glicoproteína ácida, solúvel e quantificável na saliva, co-libertada juntamente com catecolaminas pelas terminações nervosas do sistema nervoso simpático e medula adrenal.(9, 64)

Foram constatados níveis salivares de CgA significativamente superiores nos pacientes com ELA terminal, comparativamente aos pacientes com ELA moderado, demência vascular e controlo saudável (*Figura 8*). (64)

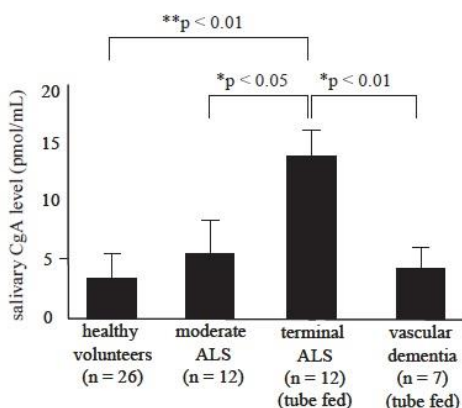


Figura 8 Comparação dos níveis salivares de CgA nos pacientes com ELA terminal, ELA moderada, demência vascular e controlo saudável. (64)

Foi também verificada uma correlação positiva e significativa entre os níveis salivares de CgA e a pontuação no funcionamento emocional do ALSAQ-40 (questionário de avaliação da ELA) nos pacientes com ELA moderada.(64) A CgA salivar pode constituir um biomarcador útil do estado efetivo nos pacientes com ELA moderada mas também em estado terminal, bem como ter um papel relevante na avaliação da eficácia do tratamento terapêutico.(9, 64)

No entanto, podem-se indicar 3 desvantagens aos níveis de CgA salivar: o facto de que os níveis salivares de CgA seguem um padrão baseado no ritmo circadiano ao longo do dia (semelhante ao cortisol salivar), o impacto do stress físico e os efeitos que as doenças orais têm nestes níveis, visto que já foram anteriormente identificadas associações significativas entre os níveis salivares de CgA e sintomas de fluxo salivar reduzido e boca seca .(9)

Portanto, a CgA salivar constata ser um útil biomarcador quantitativo indicando o estado de progressão da doença. Esta também inibe a libertação de insulina e está em concordância, nos pacientes com ELA, com os valores de insulina diminuídos verificados no soro e CSF.(12)

4 Conclusão

A acessibilidade, baixo custo, recolha fácil, não invasiva e indolor tornam a saliva num fluido corporal bastante atrativo para os profissionais de saúde como meio de diagnóstico, fonte de biomarcadores e acompanhamento terapêutico.

Nesta revisão atesta-se a importância e o potencial da saliva como fonte de biomarcadores para o diagnóstico de doenças neurodegenerativas. Proteínas como *A β 42*, *tau*, *α -sinucleína*, *DJ-1* e *cromogranina A* foram identificadas e quantificadas neste fluido corporal e permitiram a diferenciação entre os vários grupos de doenças comparativamente com indivíduos saudáveis, diferenciação de subtipos clínicos, estado individual e diagnóstico precoce. Os níveis salivares destes constituintes mostraram também ter uma boa concordância com os níveis presentes noutros fluidos corporais de relevância no diagnóstico de inúmeras doenças, nas quais se incluem as doenças neurodegenerativas, como o sangue e CSF. Adicionalmente, será necessário a realização de mais estudos de pesquisa e investigação de modo a validar e comprovar a importância destes biomarcadores no diagnóstico de doenças neurodegenerativas. No entanto, o caminho aparenta ser promissor. No futuro, a saliva poderá ser uma ferramenta clínica útil, indispensável e amplamente utilizada por todos os profissionais de saúde. O potencial é imenso.

5 Referências Bibliográficas

1. Castagnola M, Scarano E, Passali GC, Messana I, Cabras T, Iavarone F, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities. *Acta otorhinolaryngologica Italica : organo ufficiale della Societa italiana di otorinolaringologia e chirurgia cervico-facciale*. 2017;37(2):94-101.
2. Figueira J, Jonsson P, Nordin Adolfsson A, Adolfsson R, Nyberg L, Ohman A. NMR analysis of the human saliva metabolome distinguishes dementia patients from matched controls. *Molecular bioSystems*. 2016;12(8):2562-71.
3. Wang Q, Yu Q, Lin Q, Duan Y. Emerging salivary biomarkers by mass spectrometry. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;438:214-21.
4. Amado FM, Ferreira RP, Vitorino R. One decade of salivary proteomics: current approaches and outstanding challenges. *Clinical biochemistry*. 2013;46(6):506-17.
5. Carro E, Bartolome F, Bermejo-Pareja F, Villarejo-Galende A, Molina JA, Ortiz P, et al. Early diagnosis of mild cognitive impairment and Alzheimer's disease based on salivary lactoferrin. *Alzheimer's & dementia (Amsterdam, Netherlands)*. 2017;8:131-8.
6. Boston PF, Gopalkaje K, Manning L, Middleton L, Loxley M. Developing a simple laboratory test for Alzheimer's disease: measuring acetylcholinesterase in saliva - a pilot study. *International journal of geriatric psychiatry*. 2008;23(4):439-40.
7. Wormwood KL, Aslebagh R, Channaveerappa D, Dupree EJ, Borland MM, Ryan JP, et al. Salivary proteomics and biomarkers in neurology and psychiatry. *Proteomics Clinical applications*. 2015;9(9-10):899-906.
8. Segal SK. Neuroscience meets salivary bioscience: An integrative perspective. *Behavioral neuroscience*. 2016;130(2):156-75.
9. Obayashi K. Salivary mental stress proteins. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013;425:196-201.
10. Shi M, Caudle WM, Zhang J. Biomarker discovery in neurodegenerative diseases: a proteomic approach. *Neurobiology of disease*. 2009;35(2):157-64.
11. Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, et al. Salivary alpha-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*. 2011;134(Pt 7):e178.
12. Kruger T, Lautenschlager J, Grosskreutz J, Rhode H. Proteome analysis of body fluids for amyotrophic lateral sclerosis biomarker discovery. *Proteomics Clinical applications*. 2013;7(1-2):123-35.
13. Jin XF, Wu N, Wang L, Li J. Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cellular and molecular neurobiology*. 2013;33(5):601-13.
14. Kichukova TM, Popov NT, Ivanov HY, Vachev TI. Circulating microRNAs as a Novel Class of Potential Diagnostic Biomarkers in Neuropsychiatric Disorders. *Folia medica*. 2015;57(3-4):159-72.
15. Bermejo-Pareja F, Antequera D, Vargas T, Molina JA, Carro E. Saliva levels of Abeta1-42 as potential biomarker of Alzheimer's disease: a pilot study. *BMC neurology*. 2010;10:108.
16. Tsuruoka M, Hara J, Hirayama A, Sugimoto M, Soga T, Shankle WR, et al. Capillary electrophoresis-mass spectrometry-based metabolome analysis of serum and saliva from neurodegenerative dementia patients. *Electrophoresis*. 2013;34(19):2865-72.
17. Zurbig P, Jahn H. Use of proteomic methods in the analysis of human body fluids in Alzheimer research. *Electrophoresis*. 2012;33(24):3617-30.

18. Yilmaz A, Geddes T, Han B, Bahado-Singh RO, Wilson GD, Imam K, et al. Diagnostic Biomarkers of Alzheimer's Disease as Identified in Saliva using ¹H NMR-Based Metabolomics. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2017;58(2):355-9.
19. Bailey HR, Sargent JQ, Flores S, Nowotny P, Goate A, Zacks JM. APOE epsilon4 genotype predicts memory for everyday activities. *Neuropsychology, development, and cognition Section B, Aging, neuropsychology and cognition*. 2015;22(6):639-66.
20. Shi M, Sui YT, Peskind ER, Li G, Hwang H, Devic I, et al. Salivary tau species are potential biomarkers of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2011;27(2):299-305.
21. Kim W, Lee S, Hall GF. Secretion of human tau fragments resembling CSF-tau in Alzheimer's disease is modulated by the presence of the exon 2 insert. *FEBS letters*. 2010;584(14):3085-8.
22. Conrad C, Vianna C, Freeman M, Davies P. A polymorphic gene nested within an intron of the tau gene: implications for Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(11):7751-6.
23. Mollanji R, Bozanovic-Sosic R, Zakharov A, Makarian L, Johnston MG. Blocking cerebrospinal fluid absorption through the cribriform plate increases resting intracranial pressure. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2002;282(6):R1593-9.
24. Lau HC, Lee IK, Ko PW, Lee HW, Huh JS, Cho WJ, et al. Non-invasive screening for Alzheimer's disease by sensing salivary sugar using *Drosophila* cells expressing gustatory receptor (Gr5a) immobilized on an extended gate ion-sensitive field-effect transistor (EG-ISFET) biosensor. *PloS one*. 2015;10(2):e0117810.
25. Cummings JL, Cole G. Alzheimer disease. *Jama*. 2002;287(18):2335-8.
26. Bodani RU, Sengupta U, Castillo-Carranza DL, Guerrero-Munoz MJ, Gerson JE, Rudra J, et al. Antibody against Small Aggregated Peptide Specifically Recognizes Toxic Abeta-42 Oligomers in Alzheimer's Disease. *ACS chemical neuroscience*. 2015;6(12):1981-9.
27. Oh YS, Turner RJ. Effect of gamma-secretase inhibitors on muscarinic receptor-mediated calcium signaling in human salivary epithelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2006;291(1):C76-82.
28. Meng Q, Wang A, Hua H, Jiang Y, Wang Y, Mu H, et al. Intranasal delivery of Huperzine A to the brain using lactoferrin-conjugated N-trimethylated chitosan surface-modified PLGA nanoparticles for treatment of Alzheimer's disease. *International journal of nanomedicine*. 2018;13:705-18.
29. Louzada PR, Paula Lima AC, Mendonca-Silva DL, Noel F, De Mello FG, Ferreira ST. Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(3):511-8.
30. Shan L, Bao AM, Swaab DF. The human histaminergic system in neuropsychiatric disorders. *Trends in neurosciences*. 2015;38(3):167-77.
31. Salminen A, Jouhten P, Sarajarvi T, Haapasalo A, Hiltunen M. Hypoxia and GABA shunt activation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 2016;92:13-24.
32. Redjems-Bennani N, Jeandel C, Lefebvre E, Blain H, Vidailhet M, Gueant JL. Abnormal substrate levels that depend upon mitochondrial function in cerebrospinal fluid from Alzheimer patients. *Gerontology*. 1998;44(5):300-4.
33. Mapstone M, Cheema AK, Fiandaca MS, Zhong X, Mhyre TR, MacArthur LH, et al. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nature medicine*. 2014;20(4):415-8.
34. Brennan LJ, Strauss J. Cognitive impairment in older adults and oral health considerations: treatment and management. *Dental clinics of North America*. 2014;58(4):815-28.

35. Martande SS, Pradeep AR, Singh SP, Kumari M, Suke DK, Raju AP, et al. Periodontal health condition in patients with Alzheimer's disease. *American journal of Alzheimer's disease and other dementias*. 2014;29(6):498-502.
36. Tornhage CJ, Skogar O, Borg A, Larsson B, Robertsson L, Andersson L, et al. Short- and long-term effects of tactile massage on salivary cortisol concentrations in Parkinson's disease: a randomised controlled pilot study. *BMC complementary and alternative medicine*. 2013;13:357.
37. Atik A, Stewart T, Zhang J. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2016;26(3):410-8.
38. Ren R, Sun Y, Zhao X, Pu X. Recent advances in biomarkers for Parkinson's disease focusing on biochemicals, omics and neuroimaging. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2015;53(10):1495-506.
39. Chiba Y, Fujishiro H, Iseki E, Ota K, Kasanuki K, Hirayasu Y, et al. Retrospective survey of prodromal symptoms in dementia with Lewy bodies: comparison with Alzheimer's disease. *Dementia and geriatric cognitive disorders*. 2012;33(4):273-81.
40. Vivacqua G, Latorre A, Suppa A, Nardi M, Pietracupa S, Mancinelli R, et al. Abnormal Salivary Total and Oligomeric Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. *PloS one*. 2016;11(3):e0151156.
41. Zhang S, Ou R, Chen X, Yang J, Zhao B, Yuan X, et al. Correlative factors of cognitive dysfunction in PD patients: a cross-sectional study from Southwest China. *Neurological research*. 2016;38(5):434-40.
42. Kang UJ, Goldman JG, Alcalay RN, Xie T, Tuite P, Henchcliffe C, et al. The BioFIND study: Characteristics of a clinically typical Parkinson's disease biomarker cohort. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2016;31(6):924-32.
43. Noyce AJ, R'Bibo L, Peress L, Bestwick JP, Adams-Carr KL, Mencacci NE, et al. PREDICT-PD: An online approach to prospectively identify risk indicators of Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2017;32(2):219-26.
44. Cersosimo MG, Perandones C, Micheli FE, Raina GB, Beron AM, Nasswetter G, et al. Alpha-synuclein immunoreactivity in minor salivary gland biopsies of Parkinson's disease patients. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*. 2011;26(1):188-90.
45. Stewart T, Sui YT, Gonzalez-Cuyar LF, Wong DT, Akin DM, Tumas V, et al. Cheek cell-derived alpha-synuclein and DJ-1 do not differentiate Parkinson's disease from control. *Neurobiology of aging*. 2014;35(2):418-20.
46. Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, et al. Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 2013;72(2):130-6.
47. Srivannitchapoom P, Pandey S, Hallett M. Drooling in Parkinson's Disease: a review. *Parkinsonism & related disorders*. 2014;20(11):1109-18.
48. Cersosimo MG, Tumilasci OR, Raina GB, Benarroch EE, Cardoso EM, Micheli F, et al. Hyposialorrhea as an early manifestation of Parkinson disease. *Autonomic neuroscience : basic & clinical*. 2009;150(1-2):150-1.
49. Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H. Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta neuropathologica*. 2010;119(6):703-13.
50. Masters JM, Noyce AJ, Warner TT, Giovannoni G, Proctor GB. Elevated salivary protein in Parkinson's disease and salivary DJ-1 as a potential marker of disease severity. *Parkinsonism Relat Disord*. 2015;21(10):1251-5.
51. Han K, Nam GE, Kim DH, Park JB, Ko Y, Roh YK, et al. Association of Periodontitis With Urinary Albumin Excretion in Korean Adults With Diabetes: The 2012 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *Medicine*. 2015;94(42):e1839.

52. Pradeep AR, Singh SP, Martande SS, Raju AP, Rustagi T, Suke DK, et al. Clinical evaluation of the periodontal health condition and oral health awareness in Parkinson's disease patients. *Gerodontology*. 2015;32(2):100-6.
53. Abd-Elhadi S, Basora M, Vilas D, Tolosa E, Sharon R. Total alpha-synuclein levels in human blood cells, CSF, and saliva determined by a lipid-ELISA. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016;408(27):7669-77.
54. Simonsen AH, Kuiperij B, El-Agnaf OM, Engelborghs S, Herukka SK, Parnetti L, et al. The utility of alpha-synuclein as biofluid marker in neurodegenerative diseases: a systematic review of the literature. *Biomarkers in medicine*. 2016;10(1):19-34.
55. Al-Nimer MS, Mshatat SF, Abdulla HI. Saliva alpha-Synuclein and A High Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of Parkinson's Disease. *North American journal of medical sciences*. 2014;6(12):633-7.
56. Unterberger U, Lachmann I, Voigtlander T, Pirker W, Berghoff AS, Flach K, et al. Detection of disease-associated alpha-synuclein in the cerebrospinal fluid: a feasibility study. *Clinical neuropathology*. 2014;33(5):329-34.
57. Park MJ, Cheon SM, Bae HR, Kim SH, Kim JW. Elevated levels of alpha-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naive patients with Parkinson's disease. *Journal of clinical neurology (Seoul, Korea)*. 2011;7(4):215-22.
58. Foulds P, Mann DM, Allsop D. Phosphorylated alpha-synuclein as a potential biomarker for Parkinson's disease and related disorders. *Expert review of molecular diagnostics*. 2012;12(2):115-7.
59. Ibrahimagic OC, Jakubovic AC, Smajlovic D, Dostovic Z, Kunic S, Iljazovic A. Psychological Stress and Changes of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Patients with "De Novo" Parkinson's Disease. *Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)*. 2016;70(6):445-8.
60. Djamshidian A, O'Sullivan SS, Papadopoulos A, Bassett P, Shaw K, Averbeck BB, et al. Salivary cortisol levels in Parkinson's disease and its correlation to risk behaviour. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2011;82(10):1107-11.
61. Saito Y. Oxidized DJ-1 as a possible biomarker of Parkinson's disease. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2014;54(3):138-44.
62. Kang WY, Yang Q, Jiang XF, Chen W, Zhang LY, Wang XY, et al. Salivary DJ-1 could be an indicator of Parkinson's disease progression. *Frontiers in aging neuroscience*. 2014;6:102.
63. Vu LT, Bowser R. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2017;14(1):119-34.
64. Obayashi K, Sato K, Shimazaki R, Ishikawa T, Goto K, Ueyama H, et al. Salivary chromogranin A: useful and quantitative biochemical marker of affective state in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2008;47(21):1875-9.
65. Young CA, Ellis C, Johnson J, Sathasivam S, Pih N. Treatment for sialorrhea (excessive saliva) in people with motor neuron disease/amyotrophic lateral sclerosis. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(5):Cd006981.
66. Slade A, Stanic S. Managing excessive saliva with salivary gland irradiation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2015;352(1-2):34-6.

6 Anexos

Declaração

Monografia de Investigação/ Relatório de Atividade Clínica

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no Mestrado Integrado em Medicina Dentária, da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 17 de maio de 2018

A handwritten signature in blue ink, reading "Daniel Filip Sales Aguiar", is written over a horizontal line.

(O autor)

Parecer do Orientador

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante Daniel Filipe Sales Azevedo, com o título: "Saliva como fonte de biomarcadores para o diagnóstico de doenças Neurodegenerativas", está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, pois foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 17 de maio de 2018

O orientador



(Professor João Miguel Silva e Costa Rodrigues)